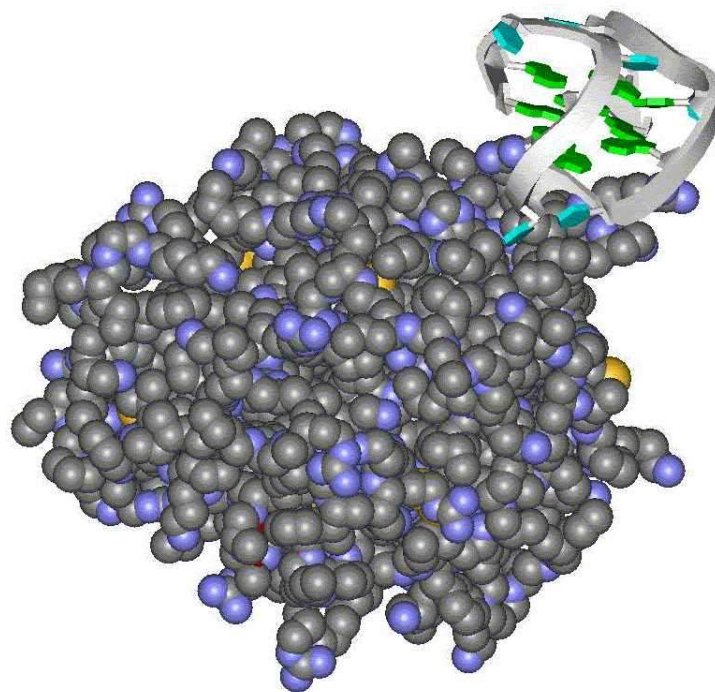


Praktikum der Physik für Fortgeschrittene

Fluoreszenz-Korrelations- Spektroskopie (FCS)

an der Universität Ulm
Abteilung Biophysik



26. März 2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	3
1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	4
1.1 Grundlagen der FCS	4
1.2 Diffusion	4
1.3 Diffusion und intramolekulare Dynamik	6
1.4 Untersuchung von Ligandenbildung mittels FCS	7
2 Beschreibung des Aufbaus	10
2.1 Versuchsanordnung	10
2.2 Beschreibung der Software	11
2.3 Kalibrierung der Apparatur	13
3 Versuchsdurchführung	15
3.1 Bestimmung des Beobachtungsvolumens mit Rh6G	15
4 Aufgaben	15
4.1 Konfokales Volumen, Diffusion von Rhodamin 6G	15
4.2 Bindung eines fluoreszierenden Oligonukleotids an seinen Komplementärstrang	16
Anhang	17
A Probenpräparation	17
B Details zur DNA Duplex-Bildung	17
C Linearität der Photodiode	18
D Einige nützliche Daten zum Versuch	19
Literaturverzeichnis	20

Abbildungsverzeichnis

1	Zwei Möglichkeiten für Fluoreszenz-Fluktuationen: Diffusion und Reaktion	5
2	Gemessene Autokorrelationsfunktion für Brownsche Bewegung von Rhodamin 6G in Wasser	5
3	Korrelationsfunktion mit Berücksichtigung der Fluktuationen eines Moleküls von einem hellen in einen dunklen Zustand	7
4	Gleichgewichtskurve für die Bindung eines fluoreszenzmarkierten DNA-Stranges mit seinem Komplementärstrang	8
5	Schematischer Aufbau der FCS-Apparatur	10
6	Benutzeroberfläche der Korrelator-Software (während einer Messung von Rh6G in Wasser)	12
7	Messung der Linearität der Photodiode	18
8	Kalibrierkurve zur Linearität der Photodiode	19

Tabellenverzeichnis

1	Zur Herstellung der DNA-B	17
2	Absorptionskoeffizienten und -maxima der Farbstoffe	19

1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie¹

1.1 Grundlagen der FCS

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurde in den frühen siebziger Jahren entwickelt, ist aber aufgrund technischer Entwicklungen, erst in den letzten Jahren interessant geworden. In Verbindung mit einer konfokalen Optik kann Licht aus einem sehr kleinen Volumenelement von nur $1\mu\text{m}^3$ (oder 1fl) zur Spektroskopie herangezogen werden, und somit Proben in ebd. Volumen untersucht werden. Aus diesem Grund wuchs die FCS in den letzten Jahren zu einer sehr leistungsfähigen Methode heran, um dynamische Prozesse von gelösten Molekülen zu untersuchen. Die Vorteile liegen in der hohen Auflösung, so dass eventuell sogar einzelne Moleküle betrachtet werden können, in der geringen benötigten Probenmenge und der kurzen Aufnahmezeit von nur wenigen Sekunden.

Das Funktionsprinzip eines Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometers ist folgendes: Durch sehr gute Fokussierung eines Lasers in einer Flüssigkeit und späteren Strahlengang durch ein Pinhole wird ein sehr kleines Beobachtungsvolumen aus der Flüssigkeit herausgegriffen. Fluoreszenz-Photonen aus diesem Volumen werden in Abhängigkeit der Zeit gezählt. Nun analysiert man die Intensitätsschwankungen des Fluoreszenzlichts. Diese hängen natürlich von den Fluktuationen der fluoreszierenden Moleküle ab, welche durch Bewegung der Teilchen aufgrund von Diffusion (Brownsche Bewegung) oder Reaktionen der Moleküle in einen nichtfluoreszierenden Zustand (z.B. Triplettzustand) verursacht werden. Aus diesem Grund kann man mit FCS z.B. Diffusionskoeffizienten oder Ratenkonstanten für fotophysikalische und chemische Reaktionen bestimmen.

Wichtig für ein Fluoreszenz-Korrelations-Experiment ist die sogenannte Autokorrelationsfunktion (siehe Abbildung 2) $G(\tau)$. Diese beschreibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals zu verschiedenen Zeiten t und $t + \tau$ und liefert damit Informationen über die Zeitskalen der beteiligten Prozesse. Dazu werden die Fluktuationen $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ (Abweichung der momentanen Fluoreszenz vom Mittelwert) eines bestimmten Zeitpunktes t mit den Fluktuationen des Zeitpunktes $t + \tau$ multipliziert. Normiert ergibt sich dann folgende Form:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

Der zeitliche Verlauf von $G(\tau)$ enthält nun Informationen über die charakteristischen Zeiten der beteiligten dynamischen Prozesse².

1.2 Diffusion

Betrachten wir zunächst nur die Brownsche Bewegung als Ursache für die Fluoreszenzschwankungen. Die Intensitätsfluktuationen können Mithilfe der Konzentrationsschwan-

¹engl.: Fluctuation correlation spectroscopy = FCS

²Zu beachten hierbei: Die Fluoreszenz ist eine Funktion der Zeit t , die Autokorrelation eine Funktion der sogenannten „lag time“ τ , welche die Verschiebung der zwei miteinander multiplizierten Fluktuationfunktionen angibt.

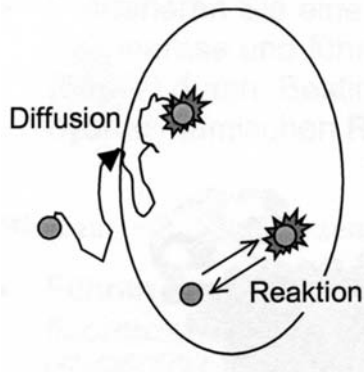


Abbildung 1: Zwei Möglichkeiten für Fluoreszenz-Fluktuationen: Diffusion und Reaktion

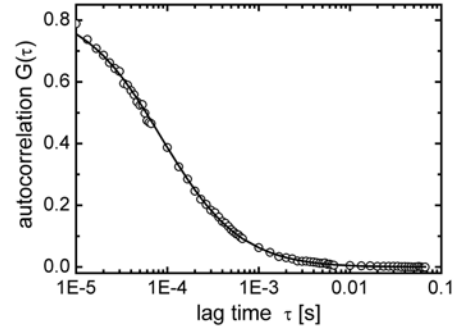


Abbildung 2: Gemessene Autokorrelationsfunktion für Brownische Bewegung von Rhodamin 6G in Wasser

kungen ermittelt werden. Wir integrieren die Änderungen der Konzentration $\delta c(\mathbf{r}, t)$, welche mit der Wahrscheinlichkeit $\phi(\mathbf{r})$ multipliziert werden, ein Photon aus einem bestimmten Volumenelement zu detektieren, über das Volumen.

$$\delta F(t) = \iiint \phi(\mathbf{r}) \cdot \delta c(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r} \quad (2)$$

Die Ausdehnung des Beobachtungsvolumens, die damit durch $\phi(\mathbf{r})$ festgelegt wird, nähert man normalerweise mit einer dreidimensionalen Gauß-Funktion. Diese hängt ab von der Radialkomponente r_0 , die durch die Größe des Laserfokus und damit durch die numerische Apertur des Objektivs bestimmt wird, und der axialen Komponente z_0 , die von der Größe des verwendeten Pinholes vor dem Detektor abhängt.

Verwendet man nun noch zur Beschreibung der Konzentrationsschwankungen das Ficksche Gesetz (3), so ergibt sich folgende Funktion (4) für frei diffundierende Moleküle:

$$\frac{\partial \delta c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta c(\mathbf{r}, t) \quad (3)$$

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Dabei ist $N = c \cdot V_{\text{eff}}$ die mittlere Zahl der Moleküle im effektiven Beobachtungsvolumen V_{eff} .

$$V_{\text{eff}} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0 \quad (5)$$

Betrachtet man die „Amplitude“ der Fluktuationen, also $G(0) = \frac{1}{N}$, so erkennt man, dass die Fluktuationen am grössten sind, wenn sich (im Mittel) am wenigsten Moleküle im Beobachtungsvolumen befinden. Dies macht auch Sinn, denn wenn nur ein Molekül im Volumen Platz hat, ist es entweder beobachtbar oder nicht. Bei vielen Molekülen macht

es prozentual nicht so viel aus, wenn ein (oder mehrere) Moleküle aus dem Volumen austreten.

Die mittlere Verweildauer der Moleküle im Beobachtungsvolumen (=„Diffusionszeit“) τ_D hängt vom Radius des Beobachtungsvolumens r_0 und vom Diffusionskoeffizienten D ab:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (6)$$

Ein Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizienten D und dem (hydrodynamischen) Radius R_H diffundierender Moleküle in Lösungen wurde schon 1905 von A. Einstein in seiner berühmten Arbeit „Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen“ angegeben. Die sogenannte Stokes-Einstein-Relation lautet:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (7)$$

Dabei ist η die (dynamische) Viskosität oder Zähigkeit der Lösung.

Auf diese Weise können nach Kalibrierung des Beobachtungsvolumens mit der FCS-Apparatur mittlere Molekülradien oder absolute Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Insbesondere können (im Hinblick auf die biophysikalische Verwendung der FCS) auch Veränderungen des Diffusionskoeffizienten zum Beispiel durch Bindung eines fluoreszierenden Liganden an ein Makromolekül, detektiert werden.

Zur Kalibrierung der Apparatur benützt man in der Regel Lösungen von Teilchen mit bekanntem Diffusionskoeffizienten D . Ein Fit der Autokorrelationsfunktion (4) mit den freien Parametern N , τ_D und $\omega = \frac{r_0}{z_0}$ an die experimentell ermittelte Funktion ermöglicht nun die Berechnung des Beobachtungsvolumens (Gleichung (5)).

1.3 Diffusion und intramolekulare Dynamik

Betrachten wir zusätzlich zur Diffusion noch die Möglichkeit, dass im Beobachtungsvolumen befindliche Moleküle in nichtfluoreszierende Zustände³ übergehen können, so müssen wir in der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ noch einen weiteren Term (den Reaktionsterm - $G_R(\tau)$) berücksichtigen.

$$G_R(\tau) = 1 + \frac{F}{1-F} e^{-k_R \tau} \quad (8)$$

$$\implies G(\tau) = G_D \cdot G_R = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \cdot \left[1 + \frac{F}{1-F} e^{-k_R \tau} \right] \quad (9)$$

Der hierbei neu eingeführte Parameter F beschreibt den Anteil der Moleküle in einem sogenannten „dunklen“ (= nichtfluoreszierenden) Zustand, $k_R = \frac{1}{\tau_R}$ die charakteristische Rate (bzw. τ_R die charakteristische Zeit) für die Fluktuation eines Moleküls zwischen dem hellen und dem dunklen Zustand. In Abbildung (3) (einer Korrelationsfunktion) erkennt man dies an einer zusätzlichen Schulter für frühe Zeiten.

³Es können sich sowohl physikalische (z.B. Singulett-Triplett-Übergang) als auch chemische (z.B. Protonierung/Deprotonierung) Prozesse abspielen.

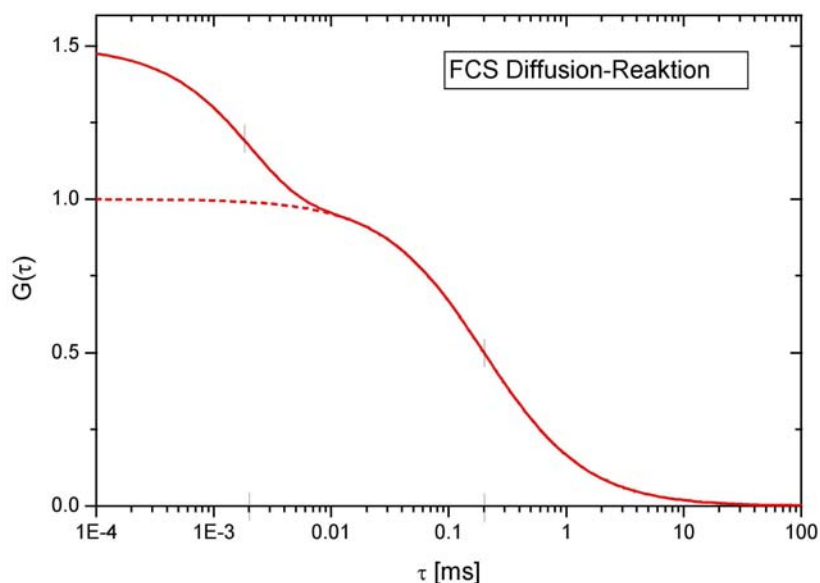


Abbildung 3: Korrelationsfunktion mit Berücksichtigung der Fluktuationen eines Moleküls von einem hellen in einen dunklen Zustand

1.4 Untersuchung von Ligandenbindung mittels FCS

Man kann mittels FCS Reaktionsgleichgewichte, so zum Beispiel die Bindung von Liganden untersuchen. Ein Ligand wird mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Dieses (in der Regel „kleine“) Molekül kann an ein größeres Makromolekül binden. Durch die veränderte Größe und damit langsamere Diffusionsgeschwindigkeit können der ungebundene und der gebundene Zustand unterschieden werden.

Die Konzentration der Moleküle wird mit M und L für die freien Moleküle und ML für die gebundenen Komplexe bezeichnet. Im Gleichgewicht gilt demnach:

$$k_{\text{on}} \cdot M \cdot L = k_{\text{off}} \cdot ML \quad (10)$$

Die Gleichgewichtskonstante, oder auch Dissoziationskonstante K_d ergibt sich als Quotient der Edukte und dem Produkt:

$$K_d = \frac{M \cdot L}{ML} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (11)$$

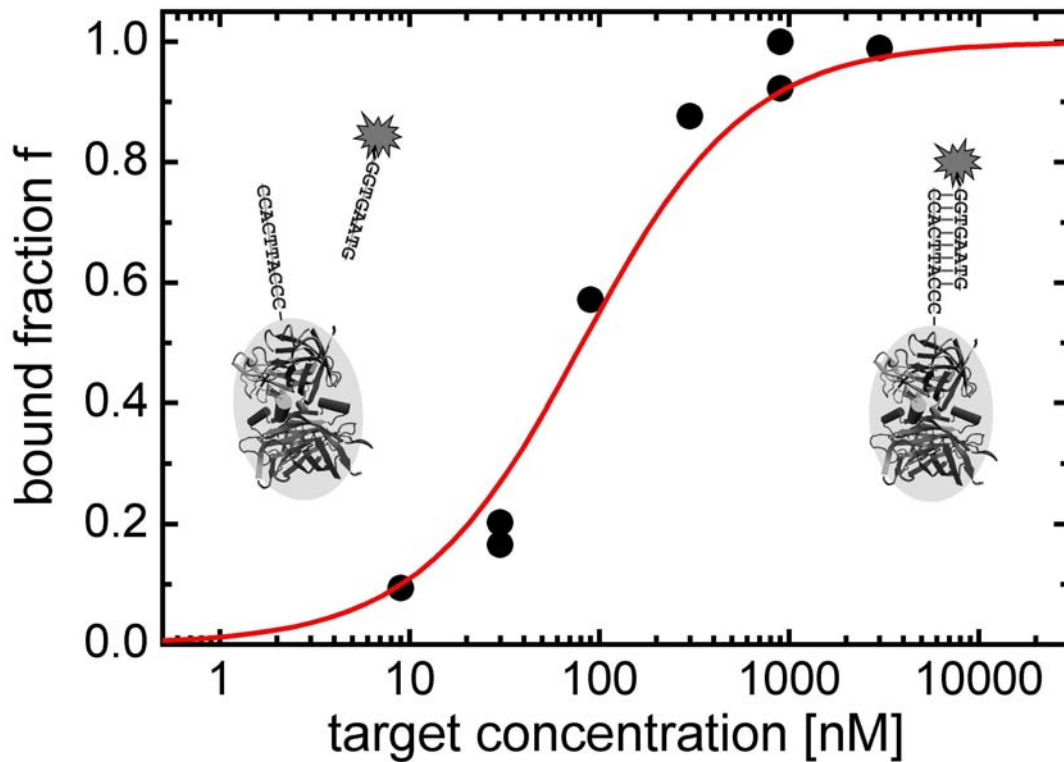


Abbildung 4: Gleichgewichtskurve für die Bindung eines fluoreszenzmarkierten DNA-Stranges mit seinem Komplementärstrang

Die Autokorrelationsfunktion für die Fluoreszenz liefert mit dem Bruchteil gebundener Liganden $x = \frac{ML}{ML+L}$ zwei Diffusionsterme⁴:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{x}{1 + \frac{\tau}{\tau_{ML}}} + \frac{1-x}{1 + \frac{\tau}{\tau_L}} \right) \quad (12)$$

Dabei sind τ_L bzw. τ_{ML} die Diffusionszeiten für den freien bzw. gebundenen Liganden. Zudem wurde angenommen, dass Absorption und Fluoreszenz des markierten Liganden bei der Bindung unverändert bleiben.

Für den Fall, dass sich diese Korrelationszeiten nur sehr wenig unterscheiden (maximal Faktor 3), so kann man in guter Näherung auch mit einem Diffusionsmodell für nur eine

⁴Zur Vereinfachung wird hier das 2D-Modell, ohne Reaktionsterm diskutiert.

Spezies gerechnet werden. Die Autokorrelationsfunktion ergibt sich hierin als:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\langle \tau_D \rangle}} \right) \quad (13)$$

Dabei bezeichnet $\langle \tau_D \rangle$ die mittlere Diffusions-Korrelationszeit, welche sich als gewichteter Mittelwert ergibt:

$$\langle \tau_D \rangle \approx x \cdot \tau_{ML} + (1 - x) \tau_L = \tau_l + (\tau_{ML} - \tau_L) x \quad (14)$$

Der Bruchteil gebundener Liganden (= Bindungsgrad) x kann nun folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$x = \frac{ML}{ML + L} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{M}} \quad (15)$$

Betrachten wir diese letzte Gleichung, so erkennen wir, dass die mittlere Diffusions-Korrelationszeit somit einer „Titrationskurve“ folgt. Deren Halbsättigung ist erreicht, wenn die freie Konzentration des Makromoleküls gleich der Dissoziationskonstanten ist.

2 Beschreibung des Aufbaus

2.1 Versuchsanordnung

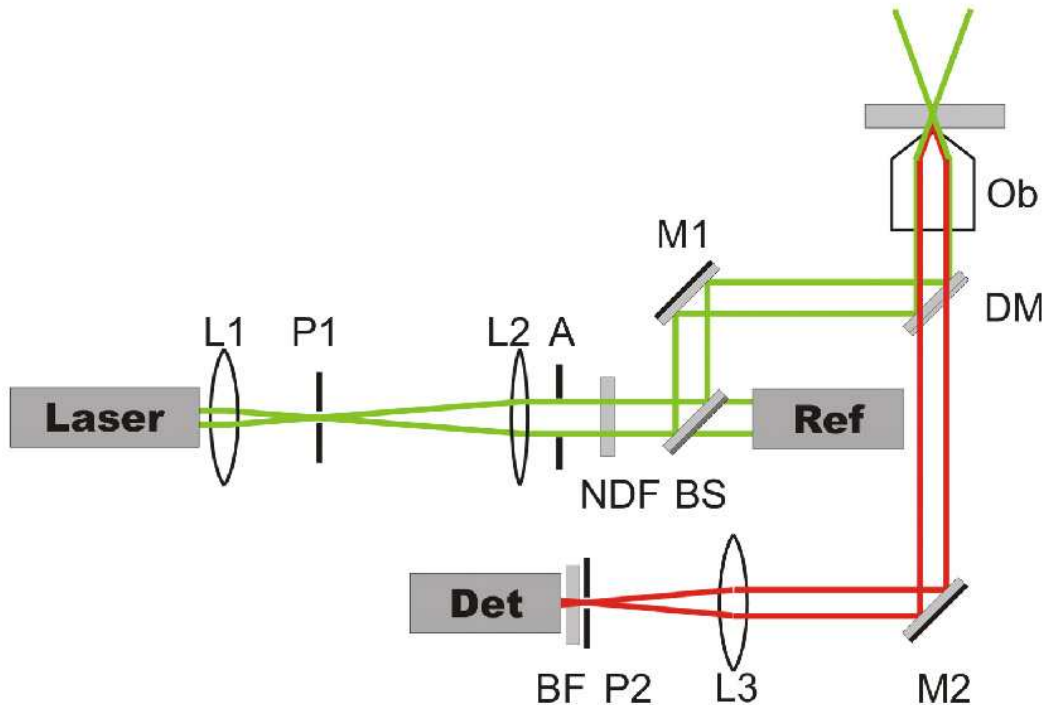


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der FCS-Apparatur

Der prinzipielle Aufbau ist in Abbildung 5 zu sehen. Die Messapparatur besteht aus einem Laser-Fluoreszenz-Mikroskop mit konfokaler Geometrie. Ein Laserstrahl, eines frequenzverdoppelten Nd-YAG-Lasers (Wellenlänge $\lambda = 532nm$) passiert eine Aufweitungsoptik mit Raumfilter (Linsen L1 und L2, Pinhole P1), wird an einem Strahlteiler (70/30; BS = beam splitter) aufgeteilt und gelangt über einen „Strahlzug“ an einen dichroitischen Teiler (DM = dichroic mirror). Der Strahlteiler ist dazu da, um über eine Photodiode (Ref)⁵ die Intensität des Lasers im laufenden Betrieb zu messen. Der dichroitische Teiler ist ein Spiegel, welcher Licht der einen Wellenlänge (hier: grün) reflektiert, Licht anderer Wellenlängen (hier: längerwelligeres Licht) aber hindurchlässt. Zusätzlich besteht noch die Möglichkeit Abschwächer (NDF = neutral density filter) einzubauen,

⁵Die Photodiode wurde so kalibriert, dass die gemessene Spannung in mV ziemlich exakt der Intensität des Laserlichts an der Probe in W entspricht.

um die Intensität des Lasers zu reduzieren. Das am dichroitischen Teiler reflektierte Laserlicht gelangt über ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur in die Probe. Dort regt es Moleküle zu Fluoreszenz an. Das ausgestrahlte, längerwellige Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gebündelt und passiert den dichroitischen Teiler. Es gelangt über einen weiteren Spiegel (M2) zu einer Linse (L3), und wird dort auf eine kleine Lochblende (P2) fokussiert. Dieses „Pinhole“ (P2) garantiert, dass nur Licht aus dem uns interessierenden Volumen zum Detektor gelangt⁶. Vor diesem ist noch ein Sperrfilter (BF = blocking filter) angebracht, der reflektiertes, grünes Laserlicht zuverlässig abblockt.

Der Detektor, ein hochempfindlicher Photonenzähler (Fotomultiplier), gibt normierte Impulse, die jeweils einem detektierten Photon entsprechen, an eine Zählerkarte im PC weiter. Dieser berechnet dann mit der im nächsten Abschnitt beschriebenen Software die Autokorrelationsfunktion noch während der Messung in Echtzeit.

2.2 Beschreibung der Software

Zuerst einmal muss die Applikation⁷ unter LabView geöffnet und gestartet (Strg+R) werden. Ein Screenshot der Anwendungsoberfläche ist in Abbildung 6 zu sehen. Danach kann man verschiedene Optionen einstellen:

Start/Stop: Mit diesem „Knopf“ kann die Messung gestartet und jederzeit angehalten werden.

read from card / read from file: Hierbei kann eingestellt werden, ob die Software die Daten aus einer Datei, oder direkt von der Messkarte einlesen soll.

Runs: Dies gibt die Anzahl Durchläufe an, die das Programm aufzeichnet. Für jeden Durchlauf wird ein Korrelogramm erstellt.

Measuring time: Dies ist die Dauer eines Durchlaufs. In dieser Zeit aufgenommene Daten werden zu einem Korrelogramm verarbeitet.

Korrelieren OFF/ON: Mit diesem (und den folgenden) Schaltern kann man verschiedene Optionen ein- bzw. ausschalten. An diesem Schalter wird eingestellt, ob die Autokorrelationsfunktion online berechnet werden soll. Ein schwarzer Kreis bedeutet, der Schalter ist aktiv (Korrelieren an).

Calculate PCH: Hiermit kann die Berechnung des PCH = photon counting histogram (im Bild rechts oben) eingeschaltet werden. Dieses zeigt die Intensitätsverteilung der gezählten Photonen an. Es ordnet die Anzahl der gezählten Photonen während einer bestimmten Zeit (PCH Bin Time) auf der x-Achse an. Die Häufigkeit eines solchen Ereignisses wird auf der y-Achse angegeben. Im Prinzip wird damit die

⁶Eigentlich blockiert das Pinhole nur Licht von anderen Ebenen der Probe, die laterale Ausdehnung des Volumens ist durch die Größe des Laserfokus definiert.

⁷Verwendet wird hierbei Robert Riegers Software-Korreliator

2 Beschreibung des Aufbaus

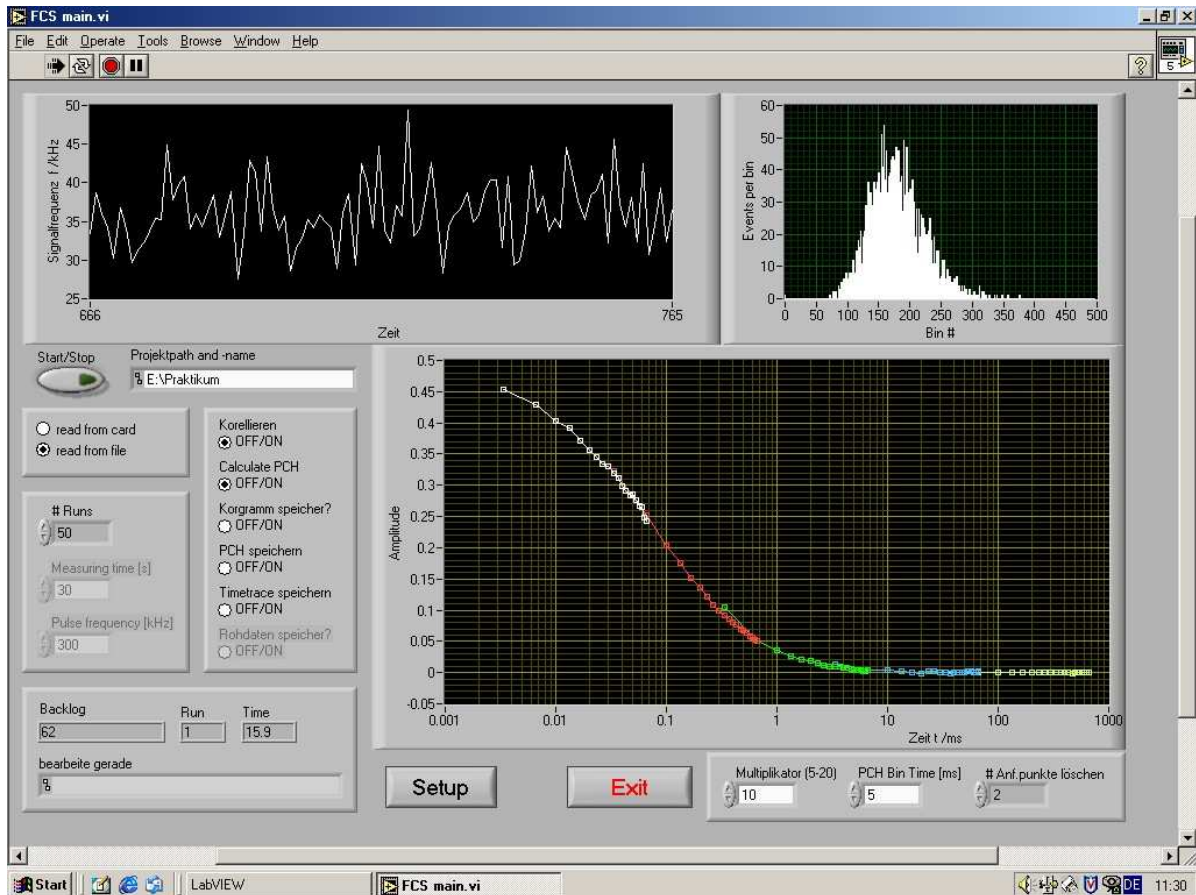


Abbildung 6: Benutzeroberfläche der Korrelator-Software (während einer Messung von Rh6G in Wasser)

Wahrscheinlichkeit angegeben eine bestimmte Anzahl Photonen in der „PCH Bin Time“ zu messen.

Für eine einzelne Sorte an fluoreszierenden Molekülen sollte dies einer Poisson-Verteilung beliebig nahe kommen. Für mehrere verschieden stark fluoreszierende Spezies ergeben sich zusätzliche Peaks, oder eine Verbreiterung der Kurve.

XXX speichern: ⁸ Mit diesen Schaltern kann man bestimmen, ob die gemessenen Daten gespeichert werden sollen. Meist reicht es, das Korrelogramm zu speichern.

Das Korrelogramm, das PCH, die Timetrace⁹ (links oben) und die Rohdaten werden mit dem oben angegebenen Dateinamen, aber anderer Endung (.asc, .pch, .ttr, .dat) gespeichert.

⁸XXX = Korrelogramm, PCH, Timetrace und Rohdaten

⁹Diese zeigt den aktuellen Messwert des Photonendetektors im zeitlichen Verlauf an.

PCH Bin Time: In diesem Feld kann die Zeit eingestellt werden, in der die Daten für einen Datenpunkt des PCH gesammelt werden. Sind die Punkte im PCH also zu groß (zu weit rechts), so kann man sie durch herabsetzen der PCH Bin Time wieder ins Fenster zurückholen. Normalerweise sind Zeiten um $10ms$ ideal.

Das Fenster im oberen, linken Bereich („Timetrace“) zeigt die aktuell gemessene Intensität des Detektors an. Mit dieser Information und eventuell mit der Intensitätsverteilung (PCH) kann man kontrollieren, ob der Fokus überhaupt in der Probe ist. Außerhalb der Probe sinkt die Intensität, an den Grenzschichten Öl/Glas bzw. Glas/Lösung wird die Intensität besonders hoch sein. Im Glas und in der Probe dagegen niedriger. Die Autokorrelationsfunktion ist dafür im Gegensatz denkbar ungeeignet. Sie gibt nur Auskunft über die Intensitätsfluktuationen (Schwankungen) der Messung, nicht über Absolutwerte. Zudem gibt die Autokorrelation keine momentanen Werte an, denn Sie berechnet sich über alle Messpunkte seit dem Start der Messung.

2.3 Kalibrierung der Apparatur

Vor der ersten Verwendung muss die FCS-Apparatur immer kalibriert werden. Dies betrifft eigentlich „nur“ den Weg des Laserstrahls. Es muss sichergestellt werden, dass dieser möglichst ideal durch alle Pinholes, Spiegel und Linsen über die Probe zum Detektor gelangt.

Dazu legt man ein Glasplättchen auf den Probenhalter und fährt das Objektiv so nah heran, dass man den Reflex der Grenzschicht erkennt. Hierzu sollte man das Auftragen des Immersionsöls auf das Objektiv (und eventuell vorheriges Reinigen mit Ethanol) nicht vergessen. Um den Reflex überhaupt beobachten zu können, bringt man ein Stück weisses Papier¹⁰ in den Strahlengang des Lichtes, unterhalb des dichroitischen Teilers. Dort sollte man den Reflex als hellen Fokus erkennen. Nun versucht man Mithilfe des „Strahlaufzugs“ (Spiegel M1 und Strahlteiler BS) den Reflex möglichst hell, und beim Bewegen des Fokus (Auf- und Abbewegen des Objektivs) so symmetrisch wie möglich zu bekommen. Vor allem sollte sich der Fokus beim Bewegen des Objektivs nicht von der Mitte wegbewegen. Diese Justierung ist in der Regel nur bei größeren Änderungen der Apparatur nötig, sollte aber trotzdem vor jedem Versuch kontrolliert werden.

Die folgende Einstellung des Strahls auf das Pinhole (P2) ist dagegen sehr wichtig und sollte vor jeder Messreihe vorgenommen werden, denn die Beeinflussung der Ergebnisse durch ungenaue Abbildung des Fokus auf das Pinhole sind enorm. Zudem verstellt sich dies durch Temperaturdrifts und Ähnliches ziemlich leicht.

Für diese Einstellung muss man den Detektor entfernen. Das heisst, er sollte auf jeden Fall ausgeschaltet sein bevor man die Abdeckung öffnet. Zuviel Licht kann den Photomultiplier (PMT) beschädigen. Danach baut man den Detektor aus, indem man die zwei Stecker und eine Feststellschraube an der Hinterseite des Detektors löst. Beim Herausnehmen sollte man darauf achten, der PMT an der Vorderseite nicht zu berühren.

¹⁰ Am Besten funktioniert es mit der Rückseite einer Visitenkarte

2 Beschreibung des Aufbaus

Nach dem Detektor muss auch noch der Blockingfilter durch einfaches Herausziehen entfernt werden. Für die folgende Einstellung der Optik ist es hilfreich, wenn es im Raum möglichst dunkel ist.

Als erstes versucht man den Laser mit dem Spiegel M2 per Augenmaß auf das Pinhole zu zentrieren. Danach bringt man wieder ein weisses Stück Papier in den Strahlengang, dieses Mal am Ende der Lichtstrecke, an der Wand des Gehäuses, aus dem man soeben den Detektor ausgebaut hat. Der Reflex des Glasplättchens sollte nun darauf zu erkennen sein. Nun muss man mit der Spiegeleinstellung (M2) so lange spielen, bis der Reflex sehr hell und symmetrisch zu sehen ist. Dazu ist es hilfreich mit dem Fokus ein wenig (!) herauf und herunter zu fahren. Wichtig ist, dass der Fokus möglichst hell und die Beugungserscheinungen möglichst symmetrisch werden!

Hat man dies erreicht, so können die Intensitätsfilter, der Detektor und der Blockingfilter wieder eingebaut und das Gehäuse verschlossen werden. Die Apparatur ist nun bereit für die erste Messung.

3 Versuchsdurchführung

3.1 Bestimmung des Beobachtungsvolumens mit Rh6G

Rhodamin 6G (Rh6G) ist ein fluoreszierender organischer Farbstoff, der Licht der Wellenlänge $\lambda = 532\text{nm}$ (unseres Nd-YAG-Lasers) sehr gut absorbiert¹¹. Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 556nm , ist also, wie für Fluoreszenz zu erwarten rotverschoben (langwelliger, mit weniger Energie).

Mithilfe der Brownschen Bewegung dieser Moleküle in einer Lösung, können wir durch eine Messung (und Bestimmung der Autokorrelationsfunktion) aus dem uns bekannten Diffusionskoeffizienten ($2,8 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ bei 22°C) das Beobachtungsvolumen bestimmen¹². Auch die Anzahl der Moleküle kann aus der Autokorrelationsfunktion bestimmt werden. Mit der Größe des Beobachtungsvolumens und der Anzahl der Moleküle ist eine Aussage über die Konzentration der gelösten Moleküle möglich.

Mit den nun bekannten Abmessungen kann in weiteren Messungen auch die Konzentration bzw. der Diffusionskoeffizient unbekannter Lösungen bzw. Moleküle bestimmt werden.¹³

4 Aufgaben

4.1 Konfokales Volumen, Diffusion von Rhodamin 6G

- Legen Sie ein Deckglas als Justierprobe auf und optimieren Sie den konfokalen Aufbau Mithilfe des Reflexes der Glas-Luft Grenzfläche des Deckglases.
- Präparieren Sie eine „Sandwich-Probenkammer“ aus 2 Deckgläsern, beschichten Sie diese mit BSA (Rinderserum-Albumin) und führen Sie zunächst FCS-Messungen an einer 20nM Rh6G-Lösung in Wasser bei geringer Laserleistung (ca. $50\mu\text{W}$) durch.
- Bestimmen Sie aus diesen Messungen mit Hilfe des bekannten Diffusionskoeffizienten für Rhodamin 6G die Geometrie des konfokalen Volumens und die Konzentration der Rhodaminprobe.
- Wiederholen Sie die Messungen bei höherer Intensität (Laserleistung zwischen $100\mu\text{W}$ und $500\mu\text{W}$). Wie verändert sich die effektive Teilchenzahl im konfokalen Volumen und die Korrelationszeit? Wie lassen sich diese Veränderungen erklären?
- Bauen Sie statt des $50\mu\text{m}$ Pinholes nun ein Pinhole mit $30\mu\text{m}$ Durchmesser ein und charakterisieren Sie für diese Geometrie Form und Größe des konfokalen Volumens.

¹¹ Das Absorptionsmaximum liegt bei 528nm

¹² Die Größe und auch das Achsenverhältnis durch Bestimmung des radialen Parameters r_0 und des axialen Parameters z_0

¹³ Da die Größe des Beobachtungsvolumens von der Tiefe des Fokus in der Probe abhängt, sollte diese während des Versuches nicht allzu großen Änderungen unterzogen werden.

4.2 Bindung eines fluoreszierenden Oligonukleotids an seinen Komplementärstrang

- Führen Sie FCS-Messungen an einer Lösung aus Alexa555-fluoreszenzmarkierten, kurzen DNA-Strängen (Oligonukleotiden) durch, die aus 8 Basen (5'-GGTGAATG) bestehen. Bestimmen Sie den hydrodynamischen Radius der Oligonukleotide.
- Untersuchen Sie nun einige Proben, die zusätzlich verschiedene Konzentrationen ($5nM$ bis $5\mu M$) eines komplementären Oligonukleotids enthalten, welches durch Kopplung an ein Streptavidin-Molekül eine wesentlich größere Masse (geringere Beweglichkeit) hat.
- Tragen Sie die gemessenen Korrelationszeiten über der Konzentration auf und ermitteln Sie die Bindungskonstante (Dissoziations-Gleichgewichtskonstante). Ermitteln Sie aus der Korrelationszeit bei Bindungssättigung den hydrodynamischen Radius der gebundenen Spezies.
- Schätzen Sie aus der ermittelten Bindungskonstante die Ratenkonstante für die Dissoziation (k_{off}) der DNA-Stränge ab, indem Sie eine diffusionskontrollierte Assoziation annehmen ($k_{\text{on}} \approx 10^8 M^{-1} s^{-1}$). Vergleichen Sie diese mit der Biotin-Streptavidin-Bindung!

Anhang

A Probenpräparation

Daten zur Pufferlösung: 2M KCl, 12mM MgCl₂, 5mM TRIS, pH 7,4

Für das Experiment benötigen wir Lösungen der DNA-B mit verschiedenen Konzentrationen. Dazu werden zuerst folgende Stammlösungen hergestellt:

DNA-F: 6nM, 200 μ l, hergestellt durch 1:200-Verdünnung aus 1,2 μ M Stammlösung.

DNA-B: 6 μ M, 16 μ l, hergestellt aus 8 μ l 12 μ M Oligo und 8 μ l 20 μ M Streptavidin.

Danach stellen wir eine 600nM und eine 60nM DNA-B aus dieser soeben erzeugten 6 μ M DNA-B her. Für die 600nM Lösung werden 18 μ l der Pufferlösung mit 2 μ l der Stamm-DNA-B (6 μ M) gemischt. Für die 60nM Lösung nimmt man nun 2 μ l der zuletzt hergestellten 600nM DNA-B, und pipettiert diese ebenfalls in 18 μ l Pufferlösung. Zuletzt stellen wir unsere zu untersuchenden Mischungen von DNA-B und DNA-F nach folgender Tabelle zusammen.

Tabelle 1: Zur Herstellung der DNA-B

Anteil 6nM DNA-F	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Anteil Pufferlösung	7 μ l	-	7 μ l	-	7 μ l	-
Anteil DNA-B	3 μ l	10 μ l	3 μ l	10 μ l	3 μ l	10 μ l
	60nM	60nM	600nM	600nM	6 μ M	6 μ M
Konzentration an DNA-B	9nM	30nM	90nM	300nM	900 nM	3 μ M

Die Messungen sollten bei einer Laserintensität (an der Probe) von 100 μ W und mit aufsteigender Konzentration erfolgen. Die Probenkammer sollte jeweils einmal mit der zu messenden Lösung ausgespült werden. Erst die zweite Füllung kann zur Messung herangezogen werden. Die Lösungen mit niedrigen Konzentrationen dürfen erst unmittelbar vor der Messung in Lowbind-Tubes präpariert werden.

B Details zur DNA Duplex-Bildung

Ein 8-mer Oligonukleotid („DNA-F“), welches am 5'-Ende mit Alexa555 fluoreszenzmarkiert ist (5'-Alexa555-GGTGAATG, $M_w = 3.5kD$), wird mittels FCS untersucht. Die Konzentration des fluoreszierenden DNA-Strangs wird für alle folgenden Experimente konstant gehalten.

Wird ein komplementäres Oligonukleotid (5'-Biotin-TEG-CCCATTCACC, $M_w = 3.4kD$) hinzugegeben („DNA-B“), welches an das Protein Streptavidin ($M_w = 52kD$) gekoppelt ist, so bilden sich DNA-Doppelstränge, die wegen der Kopplung an das Protein wesentlich größere Masse besitzen als der fluoreszenzmarkierte Einzelstrang. Daher diffundiert

die Duplex-DNA wesentlich langsamer und man findet in der FCS-Analyse eine wesentlich längere Korrelationszeit als für den freien Einzelstrang.

Durch Variation der Konzentration des Komplementärstrangs (DNA-B) kann der Bindungsgrad variiert und, wie in der Anleitung beschrieben, durch FCS-Analyse bestimmt werden. Die (freie) Konzentration, bei der die Bindung halb gesättigt ist (d.h. die Hälfte der markierten Stränge liegt als Duplex vor), entspricht der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_d .

C Linearität der Photodiode

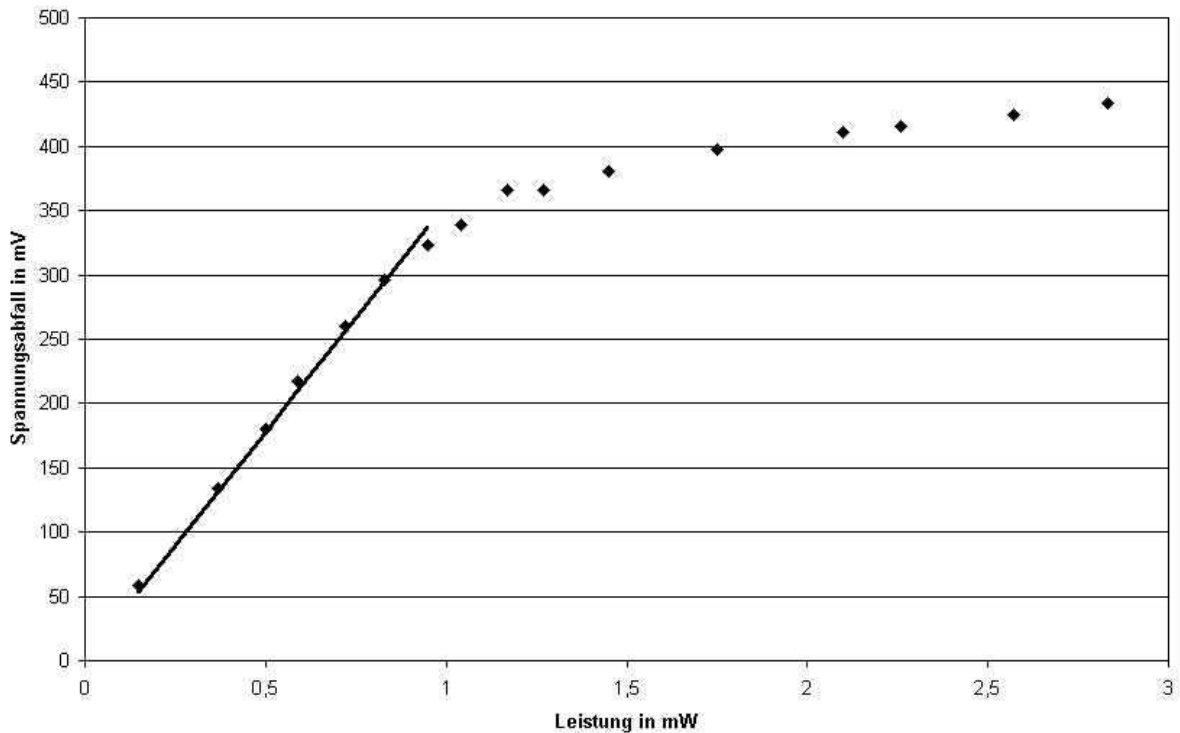


Abbildung 7: Messung der Linearität der Photodiode

Um die Leistung des Lasers in der Probelösung auch während des Versuches zu kennen wurde in den Versuchsaufbau ein Strahlteiler (BS) und eine Photodiode (Ref) zur Messung der Intensität des Lasers im Strahlengang eingefügt. Eine Messung der Diodenspannung und der tatsächlichen Leistung des Lasers mit einem Photometer ergab, dass die Diode im Bereich bis ca. 300mV (entsprechend ca. 1mW Laserleistung) relativ gut linear ist, siehe Abbildung 7.

Im nächsten Schritt wurde die Leistung des Lasers direkt am Objektiv (dort wo später die Probe liegt) mit einem Photometer und der Spannungsabfall an einem Widerstand (vom Strom der Photodiode) verglichen. Durch Auswechseln und Einstellen des „richtigen“

D Einige nützliche Daten zum Versuch

Widerstandes liefert das Spannungsmessgerät im Diodenkreis ziemlich exakt den Wert in mV , welcher der Laserleistung in μW an der Probe entspricht. Die Kalibrierkurve ist in Abbildung 8 zu sehen. Bis zu einer Leistung von $80W$ ist der Fehler unter einem Prozent.

Allerdings ist dabei aufgefallen, dass die Photodiode eine Art „Hysterese“-Verhalten zeigt. Je nachdem von welcher Richtung man zu einer bestimmten Intensität regelt zeigt die Diode zu viel, oder zu wenig an. Nach ca 10 bis 15 Minuten hat sich der Wert jedoch richtig eingestellt.

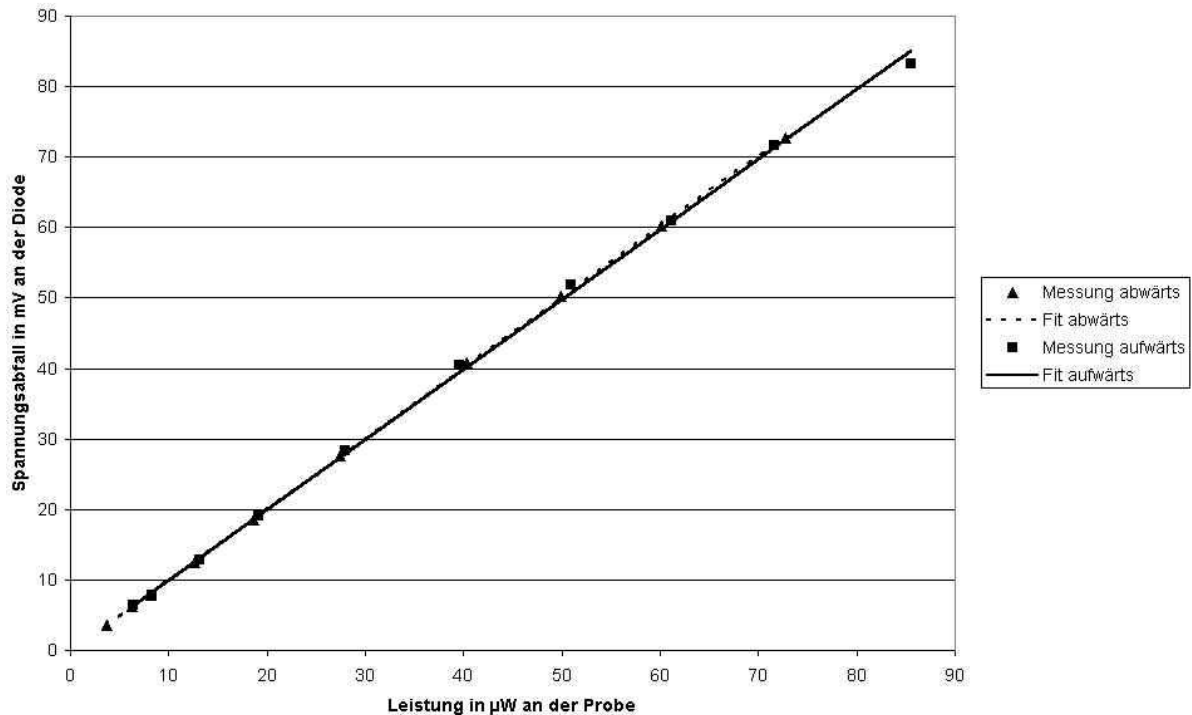


Abbildung 8: Kalibrierkurve zur Linearität der Photodiode

D Einige nützliche Daten zum Versuch

Die Absorptionskoeffizienten und -maxima der verwendeten Farbstoffe betragen:

Tabelle 2: Absorptionskoeffizienten und -maxima der Farbstoffe

Farbstoff	Absorptionsmaximum	Absorptionskoeffizient	Emissionsmaximum
Rhodamin 6G	$\lambda_A = 530nm$	$\epsilon = 105000M^{-1}cm^{-1}$	$\lambda_E = 556nm$
Alexa555	$\lambda_A = 556nm$	$\epsilon = 150000M^{-1}cm^{-1}$	$\lambda_E = 565nm$

Literatur

Der Diffusionskoeffizient von Rhodamin 6G in Wasser beträgt bei 22°C:

$$D = 2,8 \cdot 10^{-10} \frac{m^2}{s}$$

Die dynamische Viskosität von Rhodamin 6G beträgt bei 22°C:

$$\eta = 0,955 \cdot 10^{-3} \frac{Ns}{m^2}$$

Die Biotin-Streptavidin-Bindung besitzt eine Dissoziations-Gleichgewichtskonstante von:

$$K_d \sim 10^{-14} M$$

Literatur

[Rie05] R.Rieger, C.Röcker, G.U.Nienhaus, *Fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory*, Am.J.Phys.**73**,1129-1134 (2005)